CORSO INTEGRATO DI GENETICA

a.a. 2011-2012

Genetica molecolare in medicina: Analisi di Mutazioni

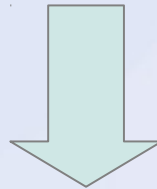
Cristina Bombieri

7 dicembre 2011

GENETICA MOLECOLARE IN MEDICINA

SVILUPPI SCIENTIFICI		APPLICAZIONI MEDICHE
Mappatura gene	→	Diagnosi indiretta (linkage)
↓		
Identificazione gene	→	Identificazione mutazioni
↓		
Classificazione mutazioni patologiche	→	Diagnosi diretta (mutazione)

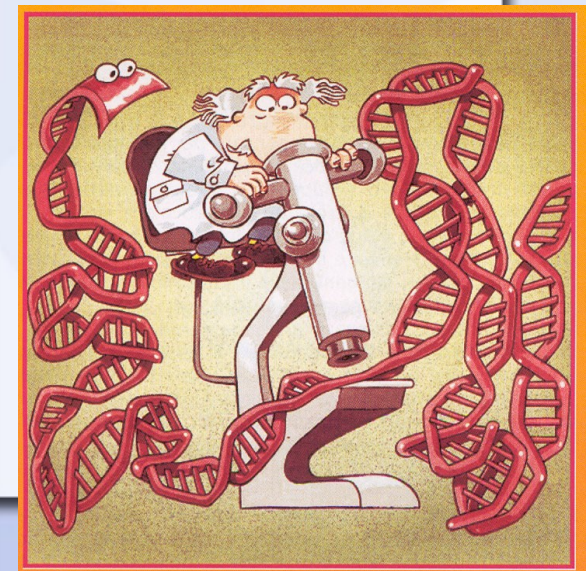
- Mutazione = variazione della sequenza nucleotidica rispetto ad una sequenza di riferimento -> alterazione ereditabile a carico della struttura primaria del DNA senza alcuna implicazione sul significato funzionale di tale cambiamento
    - Effetti evolutivi = neutra, vantaggiosa, svantaggiosa
    - Mutazione Patologica = produce una consistente alterazione della funzione svolta da un gene, determinando così l’insorgenza di una malattia
- Polimorfismo = mutazione con frequenza >1% nella popolazione

Mutazioni patologiche: Conseguenze funzionali

La presenza della mutazione può causare:

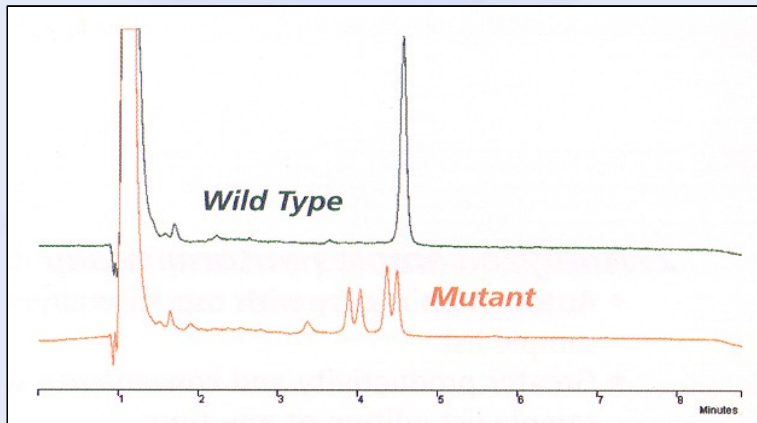
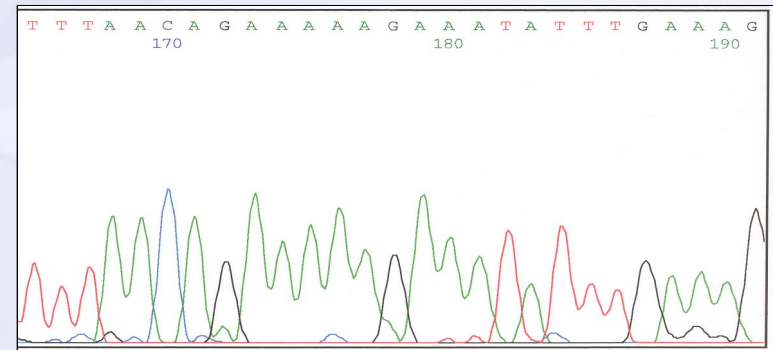
Perdita di funzione: assenza o riduzione della funzione svolta

Guadagno di funzione: aumento o creazione di nuova funzione

Le tappe dell'analisi molecolare per le malattie genetiche

1. **Identificare e sequenziare il gene malattia**
2. **Cercare le mutazioni nel gene**
3. Stabilire quali mutazioni sono patologiche
4. Determinare se esiste una distribuzione geografica/etnica delle mutazioni
5. Disegnare pannelli popolazione specifici
6. Selezionare i metodi di analisi più adatti alla ricerca delle mutazioni di interesse

Metodi per l'identificazione di mutazioni

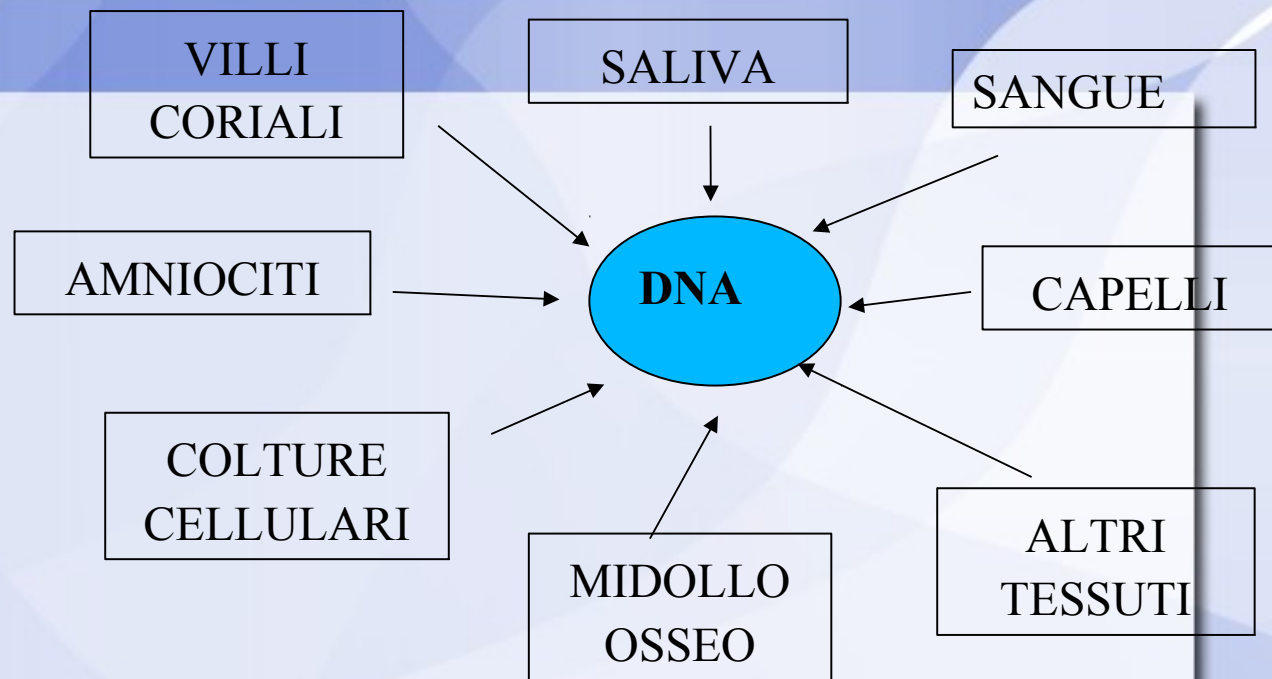
Ricerca ASPECIFICA di mutazione (ignota o nota)

Sequenziamento del DNA

Screening del gene
(DGGE, DHPLC ...)

Fonti DNA

Il DNA può essere ottenuto

da qualsiasi cellula nucleata

dell'organismo

PCR – Reazione a Catena della Polimerasi

DNA stampo

dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Taq polymerase, Mg++

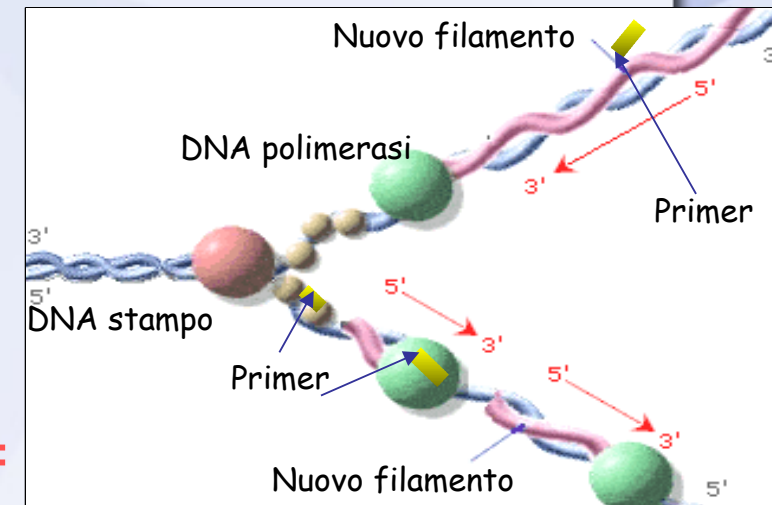
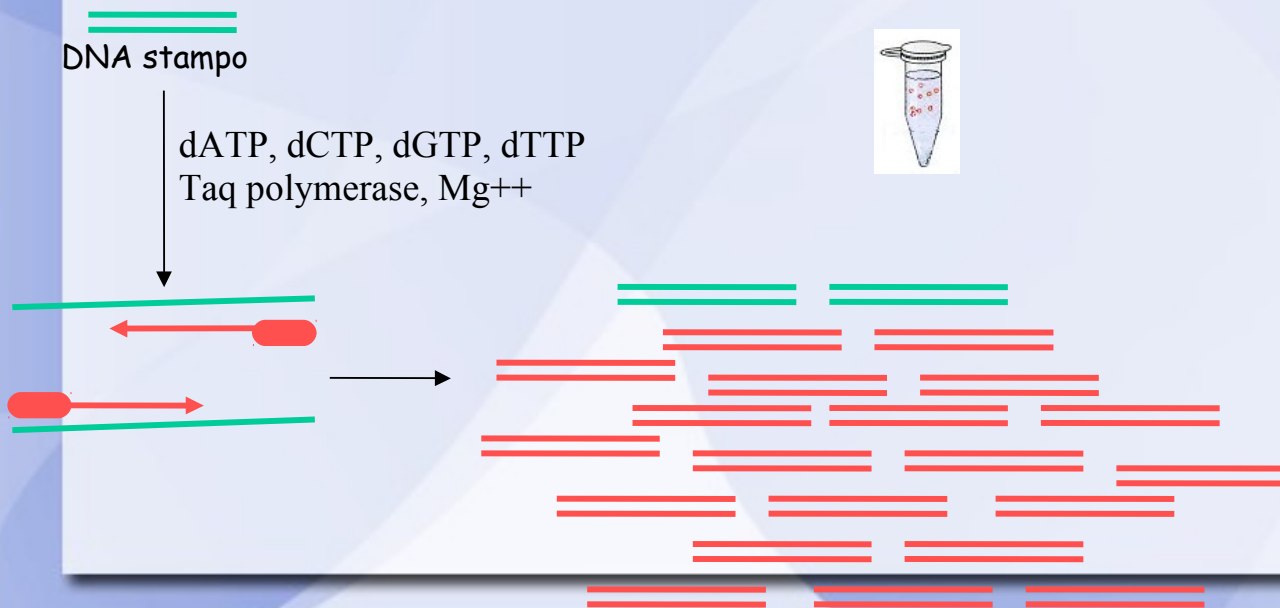
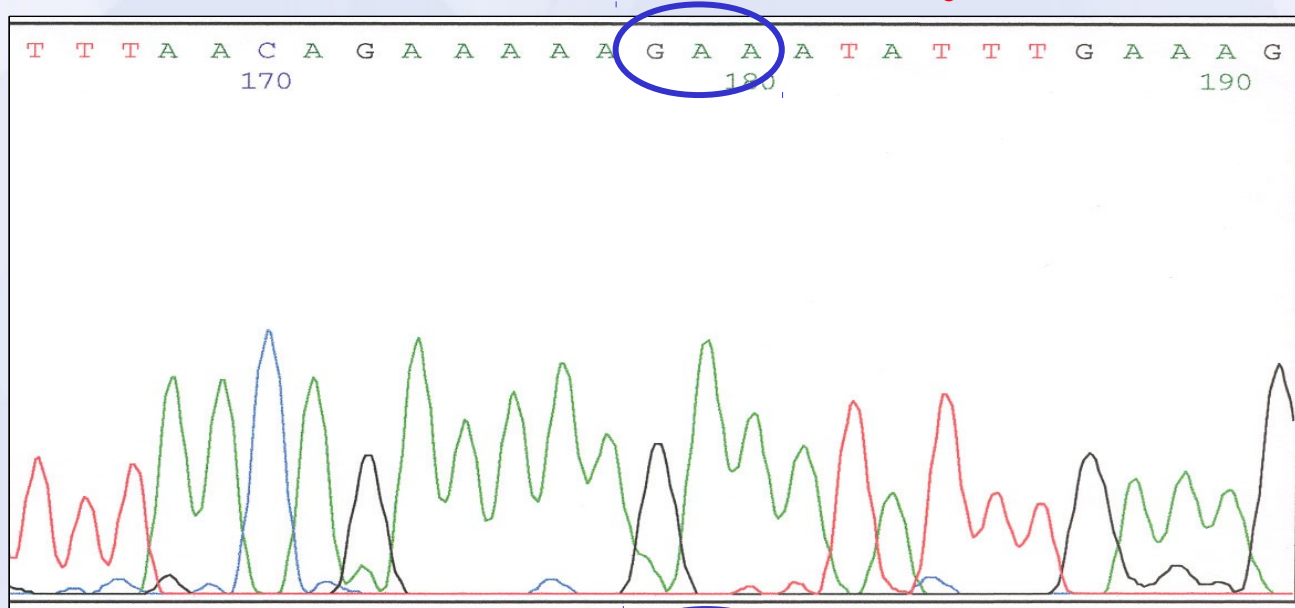
Nuovo filamento

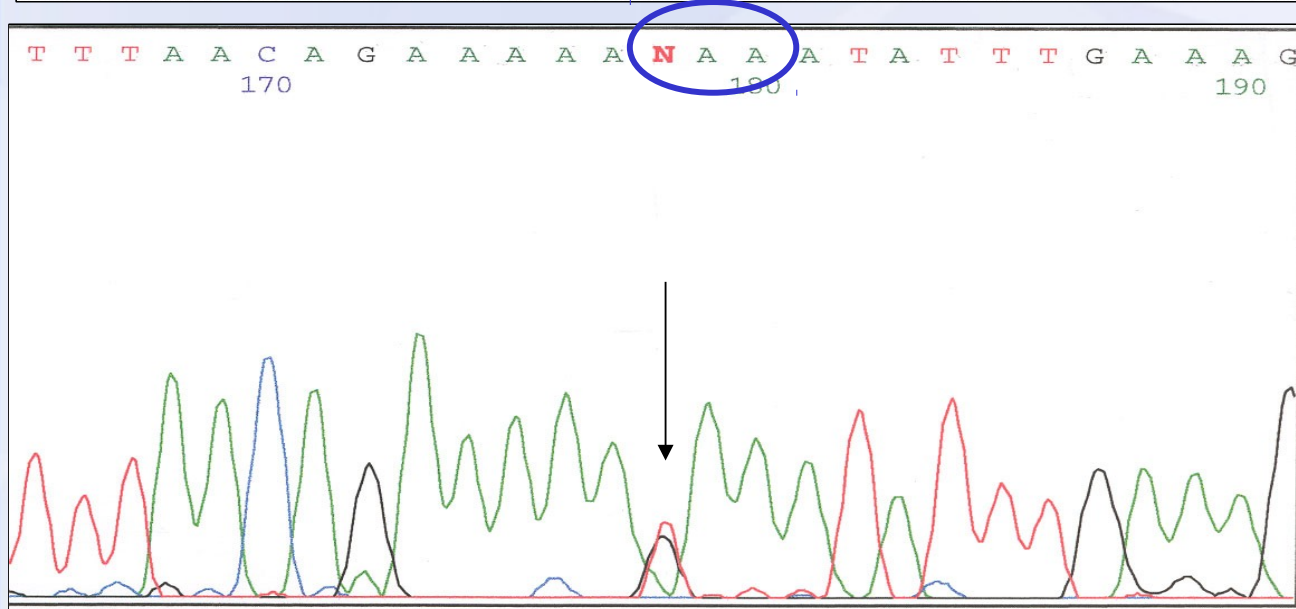
DNA polimerasi

Primer

DNA stampo

Primer

Nuovo filamento

Analisi della Sequenza del DNA

Sequenza Normale

(esone 12, gene CFTR)

1885G>T; GAA>TAA

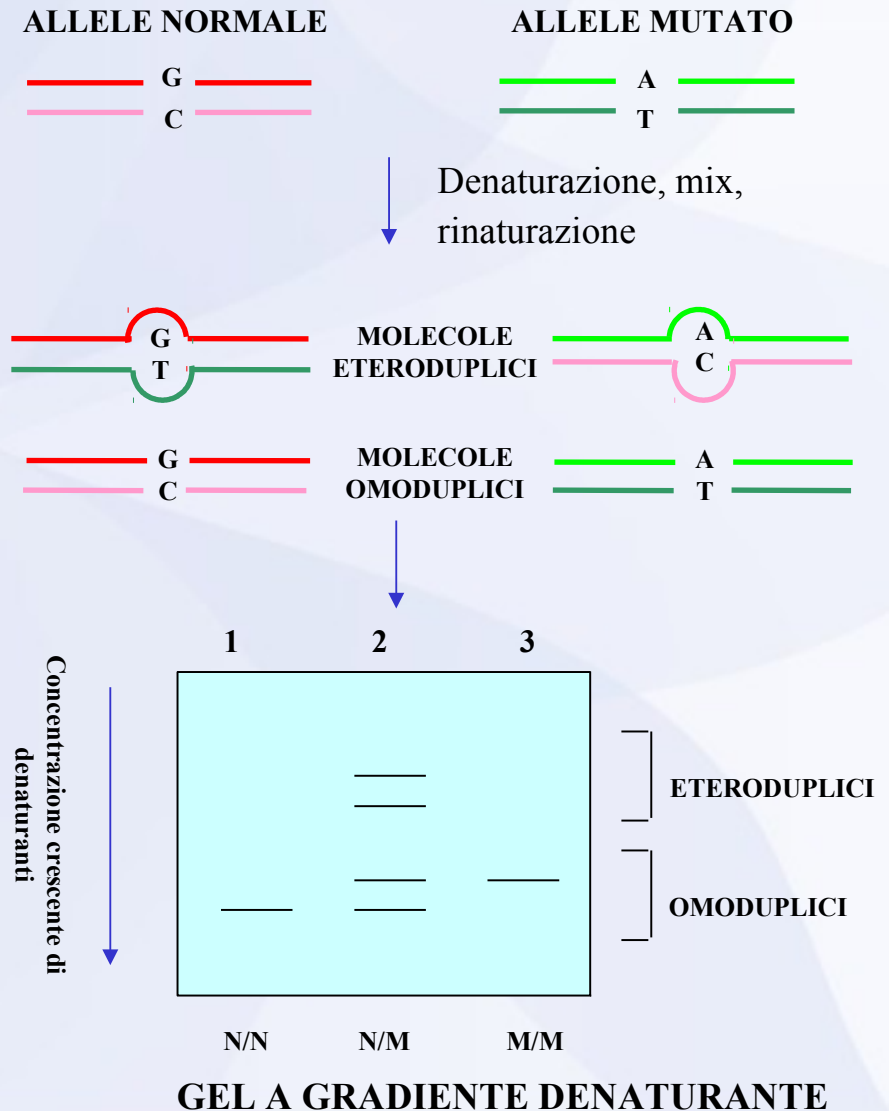
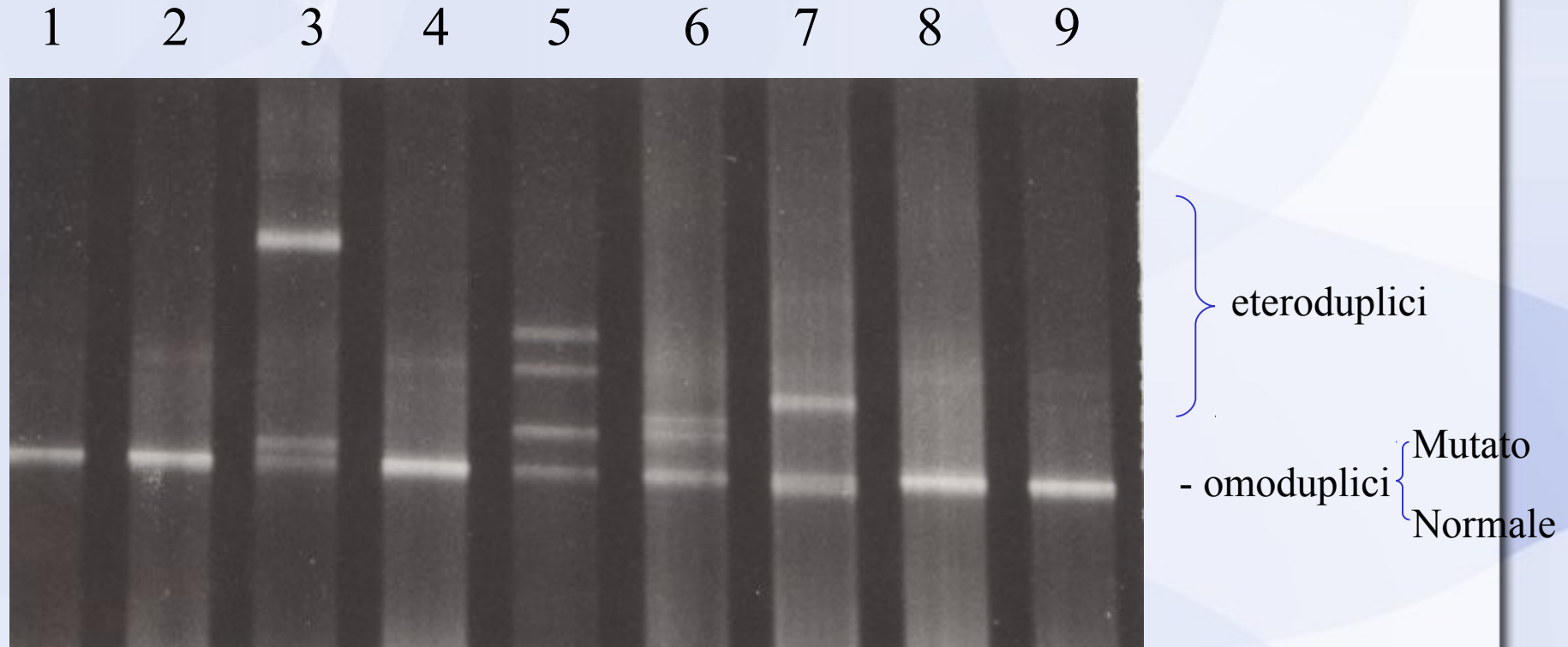
Glu > Stop

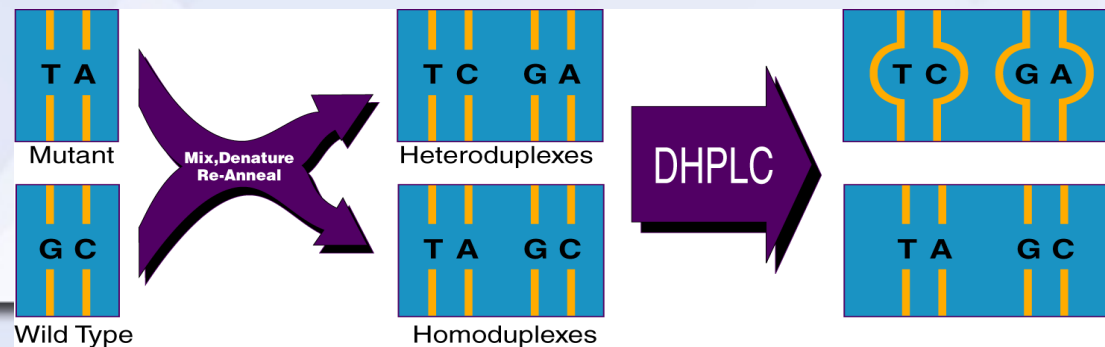
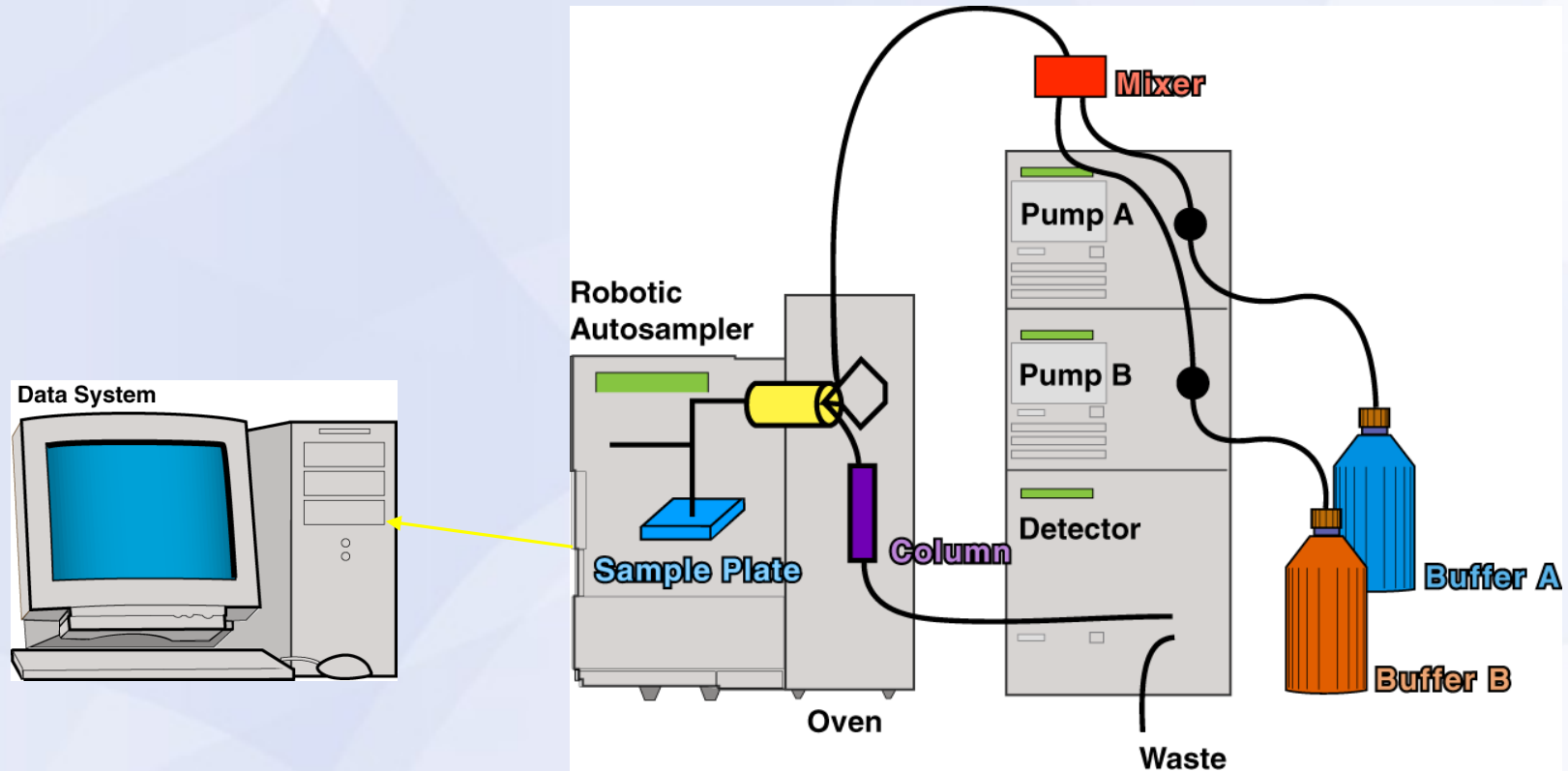
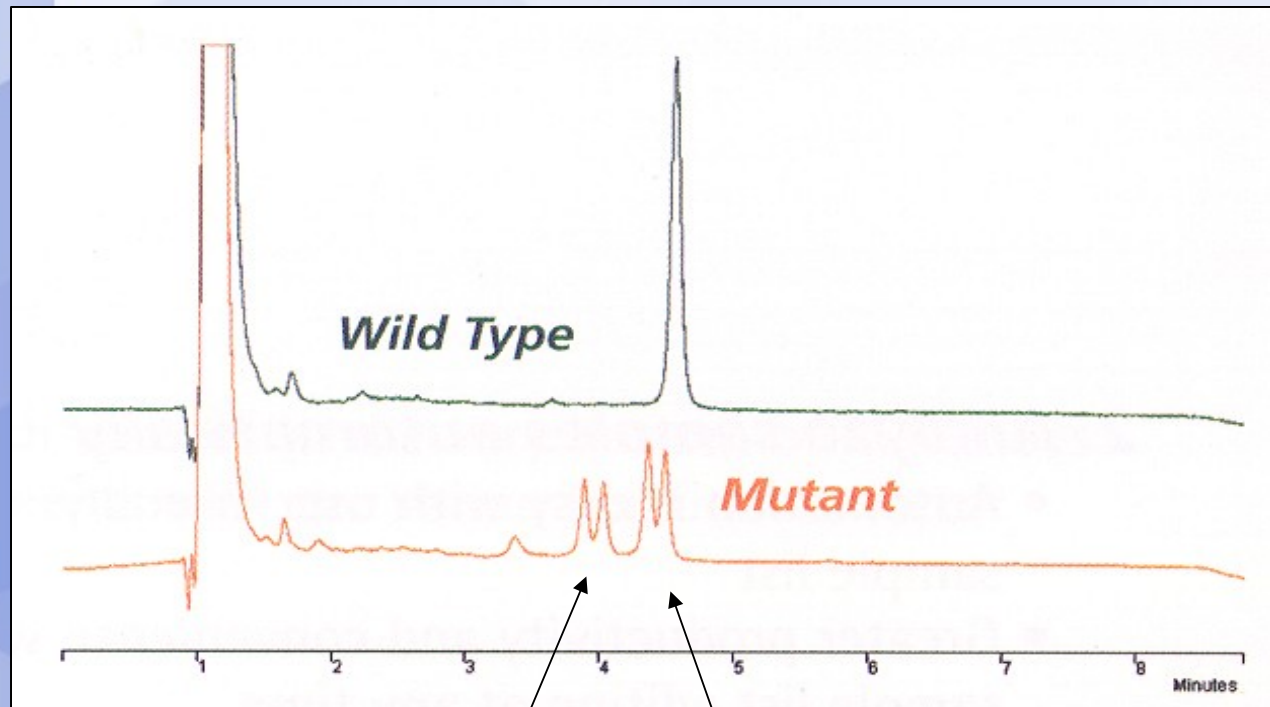
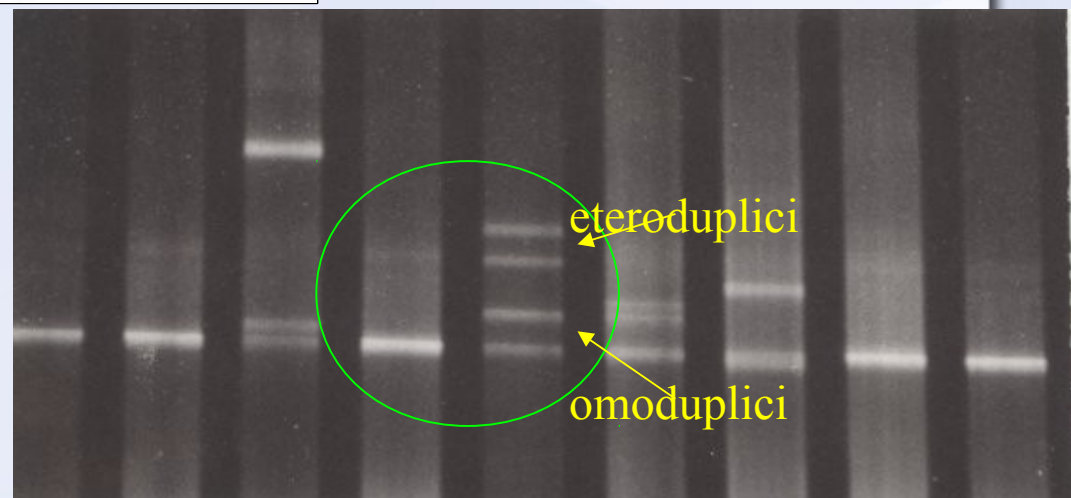
Mutazione: E585X

Analisi con gradiente denaturante (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

La Temperatura di melting (Tm) di una molecola di DNA dipendente strettamente dalla sua sequenza. Frammenti di DNA che differiscono ancheper un singolonucleotide hanno diversa Tm.

Negli eterozigoti possono formarsi molecole ibride, costituite dall'unione di un filamento normale e da un filamento mutato, che hanno Tm più bassa per la presenza dell'appaiamento errato nel sito della mutazione.

L'elettroforesi in gradiente denaturante separa le molecole di DNA in funzione della diversa Tm. E'così possibile identificare DNA normali e mutati perchè si arresteranno ad una diversa altezza nel gel.

Analisi DGGE dell'esone 19 del gene CFTR

Corsie 1 , 2, 4, 8, 9: DNA che non presentano mutazioni in questo esone
Corsie 3, 5, 7: DNA con mutazioni in questo esone (da caratterizzare con sequenziamento)
Corsia 6: controllo positivo (eterozigote I1237V)

DHPLC: Denaturing High Performance Liquide Chromatography

Ricerca di mutazioni con DHPLC

Le tappe dell'analisi molecolare per le malattie genetiche

1) Identificare e sequenziare il gene malattia
2) Cercare le mutazioni nel gene
3) **Stabilire quali mutazioni sono patologiche**
4) Determinare se esiste una distribuzione geografica/etnica delle mutazioni
5) Disegnare pannelli popolazione specifici
6) Selezionare i metodi di analisi più adatti alla ricerca delle muta

Principali criteri per classificare una mutazione come causa di malattia:

- Correlazione con il fenotipo: la mutazione è presente negli affetti, molto rara o assente nella popolazione generale
- Studi funzionali, in-vitro o in-vivo, dimostrano che la mutazione causa alterazione o assenza della funzione codificata dal gene
- La mutazione causa una grave alterazione della struttura proteica (delezioni, inserzioni, stop, frameshift, alterazioni di splicing…)

Le tappe dell'analisi molecolare per le malattie genetiche

1) Identificare e sequenziare il gene malattia

2) Cercare le mutazioni nel gene

3) Identificare quali mutazioni sono patologiche

4) Determinare se esiste una distribuzione geografica/etnica delle mutazioni

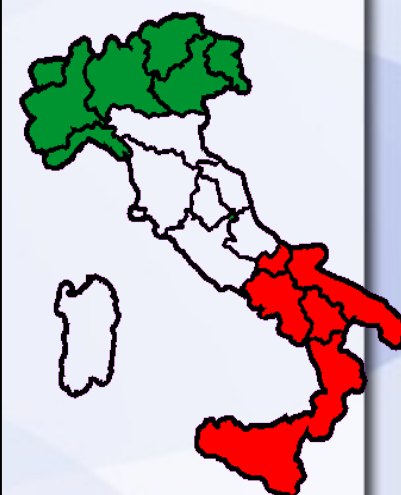
5) Disegnare pannelli di mutazioni popolazione-specifici

6) Selezionare i metodi di analisi più adatti alla ricerca delle mutazioni di interesse

Analisi della frequenza e della distribuzione geografica delle mutazioni

- Ricerca aspecifica delle mutazioni nei geni di alr
200 pazienti
- Analisi di pazienti appartenenti a popolazioni/gruppi etnici diversi
- Selezionare le mutazioni causa di malattia tra tutte quelle identificate
- Stabilire il pannello di mutazioni da analizzare in modo da coprire la maggior percentuale possibile di alleli patologici in ogni popolazione/gruppo etnico

Pannello Mutazioni CF per Veneto e Sardegna

Mutazione	Sardegna			Veneto	
	n.	%		n	%
F508del	81	52		107	48
R1162X	-	-		22	10
T338I	20	13		-	-
G542X	9	6		21	9
2183AA/G	9	6		6	3
N1303K	5	3		9	4
G1244E	3	2		-	-
711+5G/A	-	-		6	3
1717-1G/A	1	1		5	3
altre	18	11		27	10
TOT	**146/156**	**94**		**203/225**	**90**

Pannello Mutazioni CF per Veneto e Trentino AA: analisi gene CFTR in 180 pazienti (360 geni)

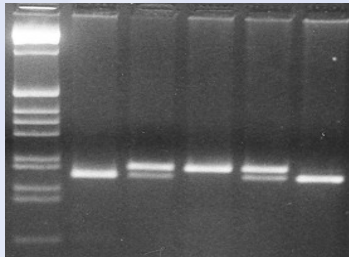
Mutazione	Frequenza %	Freq. Cumulativa %
F508del	47,6	47,6
R1162X	9,8	57,3
2183AA->G	9,3	66,7
N1303K	4,0	70,7
G542X, 711+5G->A	2,7	76,0
1717-1G->A	2,2	78,2
G85E, R553X, altre2	1,3	83,6
Altre 5	0,9 e 0,4	86,7
Totale (16 mutazioni)		**86,7**

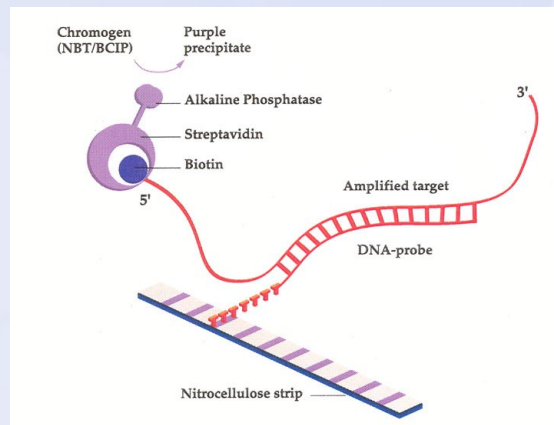
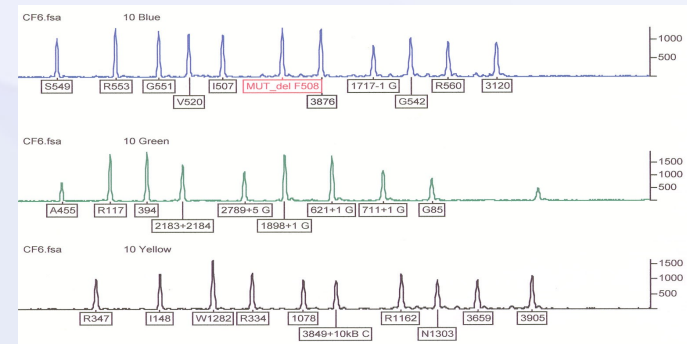
Hum. Genet. 1995; 95:397

Le tappe dell'analisi molecolare per le malattie genetiche

1) Identificare e sequenziare il gene malattia
2) Cercare le mutazioni nel gene
3) Identificare quali mutazioni sono patologiche
4) Determinare se esiste una distribuzione geografica/etnica delle mutazioni
5) Disegnare pannelli popolazione specifici
6) **Selezionare i metodi di analisi più adatti alla ricerca delle mutazioni di interesse**

Metodi per l'identificazione di mutazioni

Analisi **SPECIFICA** di una mutazione nota

Restrizione Enzimatica

OLA

RDB/ASO

Identificazione di mutazioni: le dimensioni del problema

Genoma umano (aploide):	3.000.000.000 bp
Cromosoma medio:	120.000.000 bp
Gene medio:	20.000 bp
Mutazione minima:	1 bp

REVERSE DOT BLOT: ibridazione inversa degli acidi nucleici

DNA N (normale)

DNA M (mutato)

a C g t G c a T g t A c

N M

omozigote MM

sonda N

sonda M

2

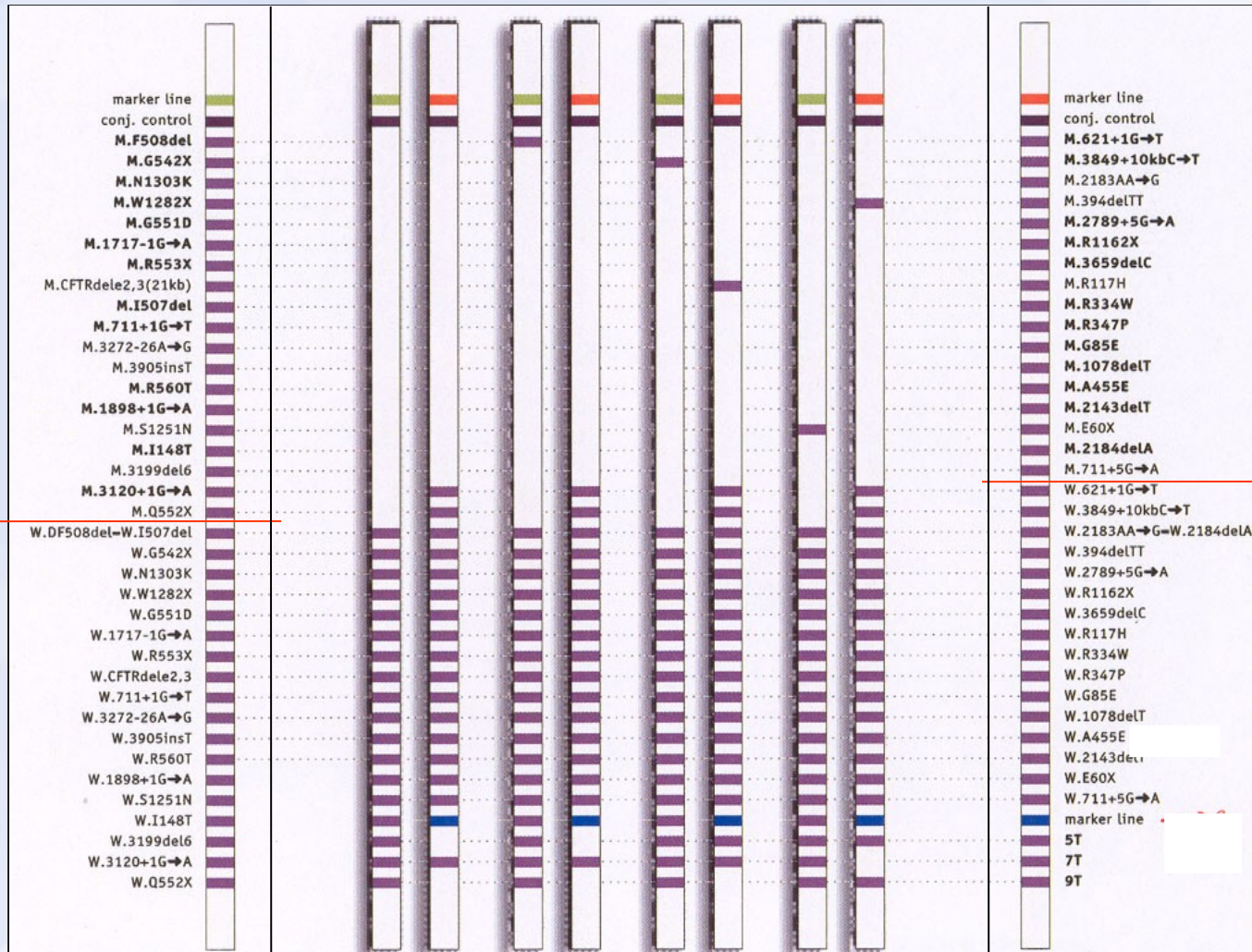
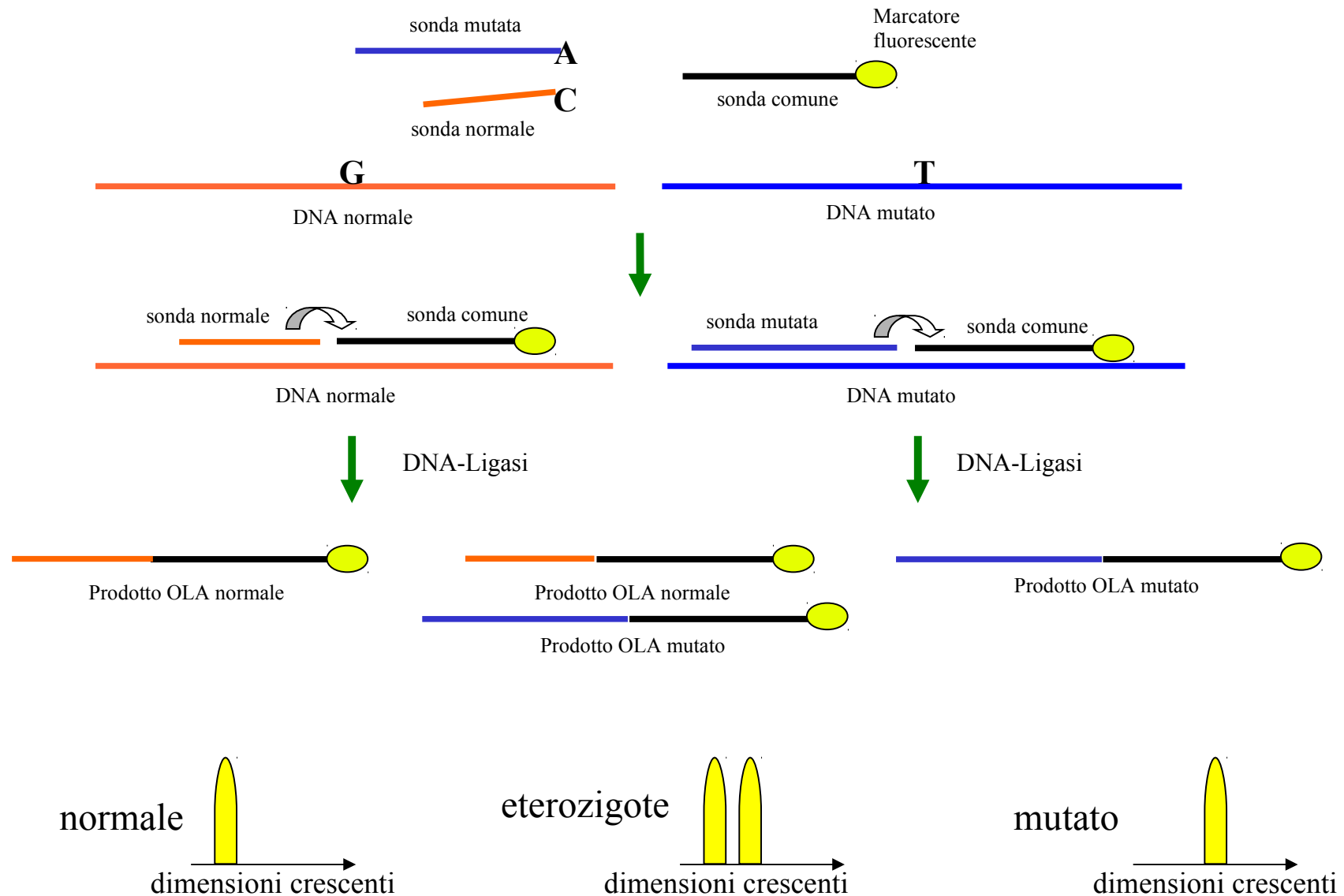
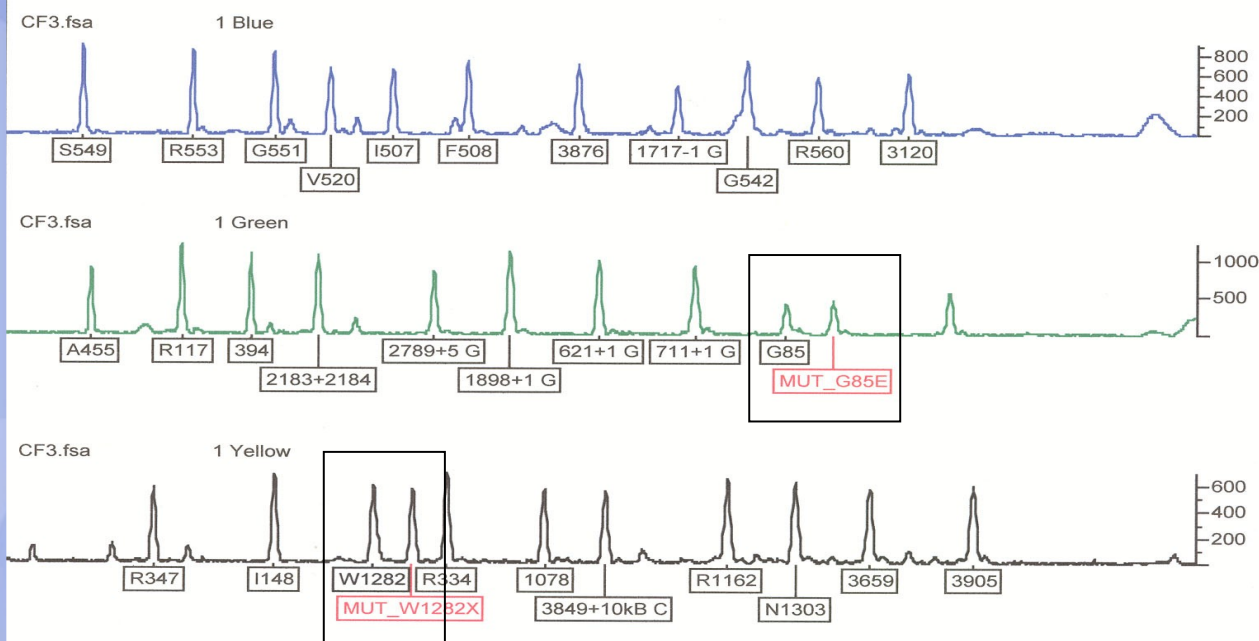
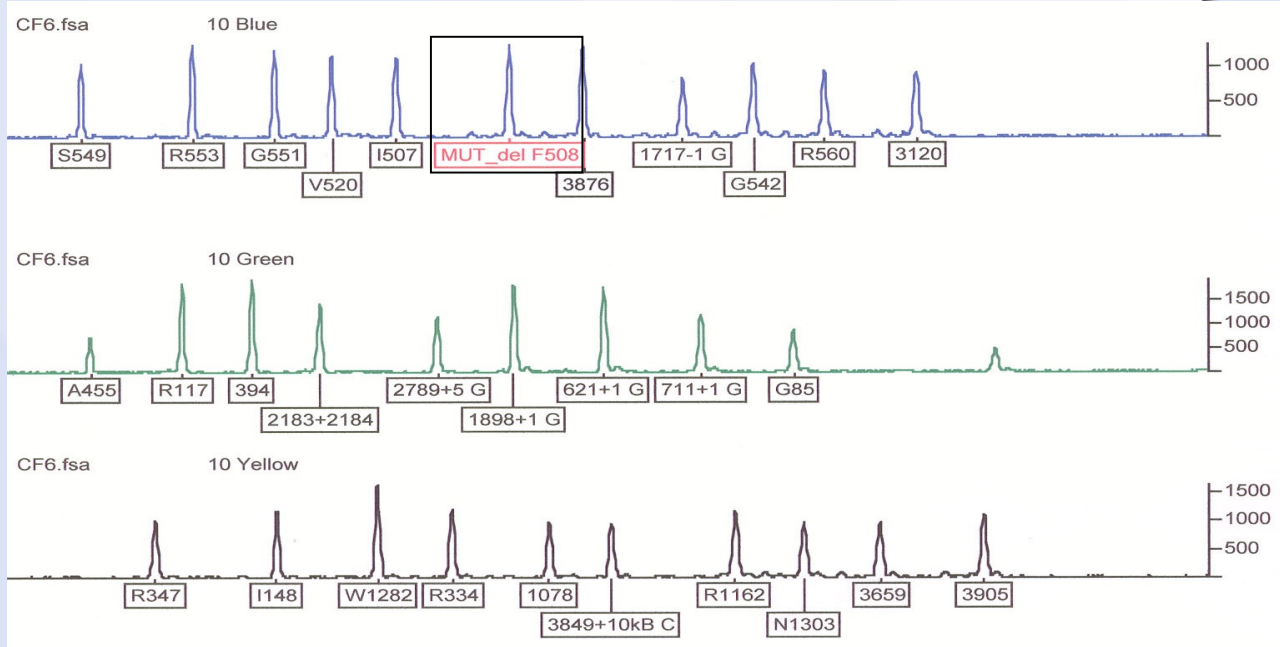
eterzigote NM

sonda N

sonda M

3

omozigote NN

RDB MULTIPLO
analisi mutazioni Fibrosi Cistica (gene CFTR)

Test di legame degli oligonucleotidi (OLA, Oligonucleotide Ligation Assay)

OLA: analisi multipla mutazioni Fibrosi Cistica

eterozigote composto

G85E / W1282X

CRITERI DI SCELTA

- Malattia in oggetto
- Mutazioni causali della patologia in questione
- Affidabilità del metodo o del kit commerciale – specificità, sensibilità, accuratezza, riproducibilità
- Tipo di test richiesto (prenatale, portatore, ecc)
- Strumentazione disponibile nel laboratorio
- Rapporto costi/benefici – test economico
- Rapidità, laboriosità, semplicità
- Validità clinica del test (capacità di predire clinical outcome: dipende da sensibilità test, Copertura del pannello mutazioni, penetranza mutazioni)
- Test specifici o aspecifici?
- Nuove tecnologie…
- Automatizzabile /uso strumentazione costosa
- Adattabile a molte mutazioni, possibilità di multiplex

FONTI DI ERRORE

- Errore dell’operatore
- Scambi di campioni
- Falsa paternità…
- Presenza di altre mutazioni/polimorfismi nell’amplificato esaminato
- Poca specificità del metodo
- Condizioni di analisi poco specifiche
- Regioni omologhe, pseudogeni…
- Nuove mutazioni
- Eterogeneità genetica
- Scelta mutazioni da analizzare

Metodi per l'identificazione di mutazioni: Applicazioni possibili

1) Ricerca diretta di mutazioni:

1a) Ricerca **aspecifica** di mutazione, ignota o nota:
significato funzionale non necessariamente noto -> identificazione nuove mutazioni, screening genetici di popolazioni numerose, (diagnosi di malattia)

1b) Analisi **specifica** di una mutazione nota:
mutazioni patologiche -> **diagnosi di malattia;**
polimorfismi, marcatori DNA -> identificazione individuale (medicina forense, trapianti midollo, …)

2) Analisi di Linkage:
identificazione nuovi geni, diagnosi indiretta di malattia

Diagnosi di malattie genetiche mediante analisi del DNA

- a) Analisi di mutazioni note nel soggetto (RE; RDB/ASO; OLA):
  - Analisi diretta/specifica delle mutazioni
  - Deve essere nota la sequenza del gene
  - Devono essere nota l'alterazione molecolare delle mutazioni da analizzare
  - Deve essere noto quali mutazioni geniche sono causa di malattia
  - Caratteristiche di un buon sistema di analisi: rapido, economico, multiplo

- b) Ricerca di mutazioni in un gene (Sequenziamento del DNA, DGGE, DHPLC):
  - Deve essere nota la sequenza del gene
  - Identifica sia mutazioni nuove che note; patologiche che non patologiche
  - Solo il sequenziamento consente di caratterizzare il difetto molecolare
  - Consentono analisi più rapida di un gene quando si hanno molti individui in esame
  - Screening di popolazione: identifica quali e quante mutazioni sono presenti

- c) Analisi di Linkage
  - Deve essere nota la localizzazione cromosomica del gene
  - Deve essere disponibile la famiglia del probando e il DNA di almeno un familiare prossimo che sia affetto
  - Devono essere disponibili marcatori informativi molto vicini al gene interessato

Perché la diagnosi molecolare?

Diagnosi di una malattia è un atto clinico

Analisi mutazioni serve a:

- Confermare diagnosi clinica
- Determinare le mutazioni specifiche per successive analisi nei familiari
  - Diagnosi Pre-Natale
  - Identificazione dei portatori
- Migliorare conoscenze rapporto genotipo/fenotipo e pato-fisiologia della malattia